Interruptin B 对小菜蛾和亚洲玉米螟幼虫的拒食活性及对斜纹夜蛾卵巢细胞的毒力

黄素青, 徐汉虹*, 童 松, 张志祥
(华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642)

摘要: 为了研究 Interruptin B 的杀虫活性, 初步探讨其杀虫作用机理, 本研究采用叶碟法和叶片浸渍法测定了 Interruptin B 对小菜蛾 *Plutella xylostella* 和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 3 龄幼虫的拒食活性和毒杀活性; 采用注射法和血球计数法研究对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫血细胞数的影响; 采用四甲基偶氮唑盐[3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]法测定对斜纹夜蛾卵巢细胞(SL 细胞)的增殖抑制作用; 采用倒置显微镜观察对 SL 细胞形态、密度和贴壁率的影响。结果显示:处理后 48 h, Interruptin B 对亚洲玉米螟和小菜蛾 3 龄幼虫的拒食中浓度(AFC_{50})分别为 108.56 和 143.88 μg/mL, 致死中浓度(LC_{50})分别为 346.23 和 194.32 g/mL; 处理后 24 h 和48 h, 对 SL 细胞的抑制中浓度(IC_{50})分别为 13.51 和 4.11 g/mL。Interruptin B 处理 SL 细胞后 12 – 48 h, 细胞密度随时间的延长而下降, 与对照差异显著($P<0.05$); 处理后 3, 6, 12, 24 和 48 h, SL 细胞变形率分别为28.18%, 83.90%, 85.18%, 93.93% 和 100%, 细胞贴壁率分别为 96.59%, 89.90%, 83.18%, 5.06% 和 1.09%, 处理后 6 – 48 h, SL 细胞变形率和贴壁率与对照差异显著($P<0.05$)。Interruptin B 对小菜蛾和亚洲玉米螟 3 龄幼虫具有良好的拒食和毒杀活性, 能显著降低斜纹蛾幼虫血细胞数量, 对 SL 细胞具有良好的增殖抑制作用, 可显著降低 SL 细胞生长密度, 改变细胞形态, 降低贴壁率, 表明该化合物可通过影响昆虫细胞活力毒杀活体昆虫。

关键词: 小菜蛾; 亚洲玉米螟; Interruptin B; 拒食活性; 杀虫活性; 斜纹夜蛾卵巢细胞
中图分类号: Q965.9 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2010)10-1104-07

Antifeedant activity of Interruptin B against *Plutella xylostella* and *Ostrinia furnacalis* and cytotoxicity against *Spodoptera litura* ovary cells

HUANG Su-Qing, XU Han-Hong*, TONG Song, ZHANG Zhi-Xiang (Key Laboratory of Natural Pesticide & Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to ascertain the insecticidal activity and probe into the insecticidal mechanism of Interruptin B, we studied its biological activity against the 3rd larvae of *Plutella xylostella* and *Ostrinia furnacalis* with leaf dipping method and the effect on the number of blood corpuscles in *Spodoptera litura* larvae by injection and blood cell count, and observed the cell proliferation inhibition of *S. litura* ovary cells (SL cells) using MTT method. Meanwhile, we observed its effect on the shape, density and the adherence rate of cells by inverted microscope. The results indicated that Interruptin B had the antifeedant and insecticidal activity against the 3rd instar larvae of *P. xylostella* and *O. furnacalis*. At 48 h post treatment, the AFC_{50} values of Interruptin B against the 3rd instar larvae of *O. furnacalis* and *P. xylostella* were 108.56 g/mL and 143.88 μg/mL, respectively, while the LC_{50} values were 346.23 μg/mL and 194.32 μg/mL, respectively. This compound also had strong inhibitive activity on the growth of *S. litura* larvae, its IC_{50} values on SL cells at 24 and 48 h post treatment were 13.51 μg/mL and 4.11 μg/mL, respectively. Significant decrease of cell density were observed by microscope in the Interruptin B treated SL cells ($P<0.05$). The deformation rates of SL cells were 28.18%, 83.90%, 85.18%, 93.93% and 100%, and the adherence rates were 96.59%, 89.90%, 83.18%, 5.06 % and 1.09% at 3, 6, 12, 24 and 48 h post treatment, respectively. The deformation rate and adherence rate of SL cells treated with Interruptin B were significantly different from those in the control at 6 – 48 h post treatment ($P<0.05$). The results show that Interruptin B possesses the antifeedant and insecticidal activity against *P. xylostella*

基金项目: 广东省农业领域重点项目(2009A020101003)
作者简介: 黄素青, 女, 广东鹤山人, 博士后, 研究方向为植物源农药, E-mail: hsuqing@126.com
*通讯作者 Corresponding author, E-mail: hhxu@scau.edu.cn
收稿日期 Received: 2010-03-06; 接受日期 Accepted: 2010-09-12

and *O. furnacalis*, and can decrease the blood cells of the larvae of *S. litura* and the density of SL cells, and has strong inhibitive activity on the growth of *S. litura* larvae. In addition, it can inhibit cell proliferation, change the cell shape, and decrease the adherence rate of SL cells. These suggest that the insecticidal activity of Interruptin B is realized by affecting the cell activity of insects.

Key words: *Plutella xylostella*; *Ostrinia furnacalis*; Interruptin B; antifeedant activity; insecticidal activity; *Spodoptera litura* ovary cells (SL cells)

当今地球上占统治地位的是被子植物，对人类经济利益影响较大的主要害虫也多以被子植物为食，因此，对昆虫与植物关系的研究往往聚焦于昆虫与被子植物的关系上，特别是起源于白垩纪晚期的鳞翅目害虫与被子植物的关系上，而非农业害虫嗜食对象的蕨类和裸子植物与昆虫的关系未引起重视。这一点在植物性杀虫剂的研究中尤其明显，植物性杀虫剂的理论基础是昆虫与植物的协同进化关系，自 20 世纪 80 年代以来，在我国应用的 44 种 108 个植物性杀虫剂中，活性成分均来自被子植物（中国农药信息网，2009）。然而，在前期杀虫植物调查中，课题组发现许多非害虫嗜食对象的蕨类和裸子植物对主要农业害虫也具有非常好的杀虫活性。在中生代活化石植物杀虫活性调查中，作者发现微红新月蕨 *Pronephrium megacuspe* 甲醇提取物对家蝇 *Musca domestica* 具有良好的毒杀活性（黄素青，2008；Huang *et al*., 2010）。微红新月蕨属于金星蕨科（Thelypteridaceae）新月蕨属 *Pronephrium*，该属共有 18 种植物，其中披针新月蕨 *Pronephrium penangianum* 具有抗菌消炎活性，被研究得较多（杨新洲，2002），三羽新月蕨 *Pronephrium triphyllum* 的化学成分也曾有报道（Tanaka *et al*., 1985）。

黄素青（2008）从微红新月蕨甲醇提取物中跟踪分离出化合物 Interruptin B，首次报道了该化合物对小菜蛾具有拒食活性。Quadri 等（2000）报道了该化合物对人鼻咽癌细胞（human nasopharyngeal carcinoma，ATCC CCL 17 细胞系 KB）的抑制活性。本研究通过测试 Interruptin B 对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫的活性，以及对斜纹夜蛾离体培养卵巢细胞（SL 细胞）的影响，进一步明确 Interruptin B 的杀虫活性，并探讨其作用机理，为该化合物的开发利用提供依据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

小菜蛾 *Plutella xylostella*：从田间采回小菜蛾的幼虫和蛹，在室内用菜心苗连续多代饲养，成虫饲料为 10% 蜜糖水。

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*：室内连续多代饲养，成虫饲料为 10% 蜜糖水，幼虫饲料为黄豆粒 + 琼脂 + 医用酵母片。

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*：从华南农业大学农场芋头叶上采集卵块，孵化后，低龄幼虫用芋头叶饲养，高龄幼虫用木薯叶饲养。

1.2　供试细胞

SL 细胞系为斜纹夜蛾离体培养卵巢细胞系，引自华中师范大学，由华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室传代培养。培养温度为 27℃，无需 CO_2，在单层细胞生长至铺满整个瓶底时，用吸管轻轻吹打成细胞悬液，以 1∶3 的比例传代培养。培养基为 Grace's 昆虫细胞培养基，加适量酵母提取物和水解乳蛋白，用超纯水溶解。

1.3　供试药剂

94.5% 鱼藤酮原药：华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室自制，经 Sigma 公司标准品标定。

97.2% 印楝素原药：华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室分离所得。

Interruptin B：从微红新月蕨 *P. megacuspe* 中分离所得，含量为 90.4%，其结构式见图 1（Quadri *et al*., 2000；黄素青，2008）。

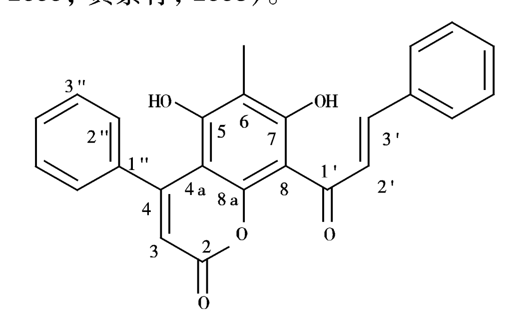


图 1　Interruptin B 的化学结构

Fig. 1　Chemical structure of Interruptin B

1.4　Interruptin B 对供试昆虫的活性测定

1.4.1　药液配制：少量二甲基亚砜（DMSO）溶解

Interruptin B，加入 0.2% 乳化剂吐温 80，用水定容，DMSO 最终含量为 5%，根据预备实验结果配制 5 个所需浓度溶液。并设溶剂、乳化剂和清水空白对照。

1.4.2 拒食活性测定：采用叶碟法（张国洲等，2000），具体方法是用配制好的药液浸渍直径 1 cm 的甘蓝叶碟 3 s，晾干，然后将叶碟放入垫有湿润滤纸的培养皿中，每皿放入 4 片叶碟。每皿内放入已饥饿 4 h 的小菜蛾 3 龄幼虫 1 头，每处理重复 10 次，每处理总虫数 10 头（n = 10）。48 h 后测量各处理剩余叶面积，然后计算每头幼虫的取食率。试验中根据幼虫取食情况及时添加经过相同处理的叶碟。亚洲玉米螟的试验方法同小菜蛾，甘蓝叶碟换成玉米心叶叶碟。

1.4.3 毒杀活性测定：采用叶片浸渍法，用配好的药液浸渍甘蓝叶片（玉米心叶）3 s，待溶剂挥发干后放入垫有湿润滤纸的培养皿中，每皿 2 片叶片，接入已饥饿 4 h 的 3 龄小菜蛾（或亚洲玉米螟）幼虫 10 头，每处理重复 3 次，每处理总虫数 30 头（n = 30）。处理后 48 h 检查试虫的死亡率。

1.4.4 对斜纹夜蛾幼虫血细胞量的影响：用丙酮 + 水（1∶1，v/v）将药剂配成供试浓度，用微量注射器在斜纹夜蛾 4 龄幼虫的第 2 对和第 3 对腹足之间注射，针头朝向虫头，在腹部侧面注入 1 μL 药液，对照注射等量丙酮 + 水（1∶1，v/v）混合物。注射完毕后，将试虫放入垫有保湿滤纸的培养皿中，并放入新鲜的木薯叶片，将培养皿置于养虫室（25 ± 1℃）中，分别于 24 和 48 h 后对幼虫血细胞进行计数（邓日强和利翠英，1995），每处理 3 个重复，每重复取试虫 10 头，每处理总虫数 30 头（n = 30）。

1.5 Interruptin B 对 SL 细胞的活性测定

1.5.1 药液配制：用少量 DMSO 将供试化合物溶解后配成母液，在超净工作台上以 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌，并用含 1% DMSO 的培养基分别将药剂配成试验所需浓度，DMSO 的最终浓度为 1% 。以含 1% DMSO 的培养基为对照。

1.5.2 Interruptin B 对 SL 细胞增殖的影响：四甲基偶氮唑盐[3-(4，5-dimethylthiazole-2-yl)-2，5-diphenyltetrazolium bromide，MTT]比色法（Stipanovic *et al*.，1990；周青春等，1997；Himeji *et al*.，2007）：称取 50.0 mg MTT，加入 10 mL 无血清培养基，待完全溶解后过滤，此时 MTT 溶液的浓度为 5 mg/mL，置于 4℃ 冰箱中备用。取对数生长期的 SL 细胞接种于 96 孔培养板内，每孔加入100 μL，培养 24 h，将培养板翻转倒出培养液，每孔加入 100 μL 相应浓度的药液，每处理 6 次重复。各组细胞经药剂处理后，每孔加入 MTT 溶液 10 μL 并轻微震荡，放入 27℃ 继续培养 4 h 后倒出培养液，每孔加入 100 μL DMSO 用酶标仪进行检测 490 nm 的吸光值。整个过程需避光。以对照的细胞相对活力为 100%，将各组吸光值按以下公式换算为细胞相对活力。细胞活力小于 100% 表示药剂降低了细胞活力，反之则表明药剂对细胞活力无明显影响。

细胞活力（%）=（调零后受试组 OD_{490}/调零后对照组 OD_{490}）× 100

细胞抑制率 = 1 − 细胞活力%

1.5.3 倒置显微镜下观察细胞形态：取对数生长期 SL 细胞以 5×10^4/mL 密度接种于培养皿（Φ = 60 mm）中，孵箱中培养 24 h 后弃去上清液，处理组分别加入含不同浓度（10，5，2.5，1.25，0.625 μg/mL）Interruptin B 的培养基，对照组加入等量培养基。分别于 3，6，12，24 和 48 h 在 XD-101 型倒置显微镜下观察细胞的生长情况和形态变化，计算 SL 细胞的变形率、细胞密度变化和贴壁率。

1.6 数据统计与分析

采用 DPS 软件进行数据统计分析。分别应用新复极差多重比较法（DMRT）和 *t* 检验进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 Interruptin B 对亚洲玉米螟和小菜蛾 3 龄幼虫的拒食活性

以印楝素为对照，采用叶碟法，研究了 Interruptin B 对亚洲玉米螟和小菜蛾幼虫的非选择性拒食活性。结果表明，Interruptin B 对小菜蛾和亚洲玉米螟 3 龄幼虫有良好的拒食活性（表 1）。处理后 48 h，Interruptin B 和印楝素对亚洲玉米螟 3 龄幼虫的拒食中浓度（AFC_{50}）分别为 108.56 和 0.46 μg/mL，两者差异显著（$F = 390.91$，$df = 1, 9$，$P = 0.0025$）；对小菜蛾 3 龄幼虫的 AFC_{50} 值分别为 143.88 μg/mL 和 0.74 μg/mL，两者差异显著（$F = 791.94$，$df = 1, 9$，$P = 0.0013$）。

2.2 Interruptin B 对亚洲玉米螟和小菜蛾 3 龄幼虫的毒杀活性

以鱼藤酮为对照，采用叶片浸渍法，研究了 Interruptin B 对亚洲玉米螟和小菜蛾幼虫的毒杀活性，结果见表 2。

表 1　Interruptin B 和印楝素处理 48 h 后对亚洲玉米螟和小菜蛾 3 龄幼虫的拒食活性

Table 1　Antifeedant activities of Interruptin B and azadirachtin against 3rd instar larvae of *Ostrinia furnacalis* and *Plutella xylostella* at 48 h post treatment

处理 Treatment	供试昆虫 Test insects	毒力回归方程 Toxicity regression equation	AFC_{50}(95% CI) (μg/mL)	*P* 值 *P*-value in *t* test
Interruptin B	亚洲玉米螟 *O. furnacalis*	$y = 2.4304 + (1.2623 \pm 0.120)x$	108.56(86.58 – 136.13) **	0.65
	小菜蛾 *P. xylostella*	$y = 2.2701 + (1.2650 \pm 0.118)x$	143.88(113.41 – 182.54) **	1.41
印楝素 Azadirachtin	亚洲玉米螟 *O. furnacalis*	$y = 5.5548 + (1.6248 \pm 0.264)x$	0.46(0.39 – 0.53)	0.98
	小菜蛾 *P. xylostella*	$y = 5.2018 + (1.5756 \pm 0.332)x$	0.74(0.63 – 0.88)	3.87

** 不同药剂处理同一试虫后在 0.01 水平上差异显著（*t* 检验，$P < 0.01$）。** There are significant differences between the data of the same test insects and different treatments at the 0.01 level (*t* test, $P < 0.01$).

表 2　Interruptin B 和鱼藤酮处理 48 h 后对亚洲玉米螟和小菜蛾 3 龄幼虫的毒杀活性

Table 2　Toxicities of Interruptin B and rotenone against 3rd instar larvae of *Ostrinia furnacalis* and *Plutella xylostella* at 48 h post treatment

处理 Treatment	供试昆虫 Test insects	毒力回归方程 Toxicity regression equation	LC_{50}(95% CI) (μg/mL)	*P* 值 *P*-value in *t* test
Interruptin B	亚洲玉米螟 *O. furnacalis*	$y = -0.4664 + (2.1527 \pm 0.304)x$	346.23(266.75 – 449.40)	1.44
	小菜蛾 *P. xylostella*	$y = 0.3348 + (2.0385 \pm 0.299)x$	194.32(146.09 – 258.47)	2.13
鱼藤酮 Rotenone	亚洲玉米螟 *O. furnacalis*	$y = -0.5490 + (2.1682 \pm 0.153)x$	362.43(280.26 – 468.70)	2.04
	小菜蛾 *P. xylostella*	$y = 0.3975 + (1.8410 \pm 0.270)x$	316.23(237.66 – 420.79)	1.55

从表 2 可以看出，Interruptin B 对小菜蛾 3 龄幼虫具有良好的毒杀活性，对亚洲玉米螟 3 龄幼虫毒杀活性不佳。处理后 48 h，Interruptin B 和鱼藤酮对小菜蛾 3 龄幼虫的致死中浓度（LC_{50}）分别为 194.32 和 316.23 μg/mL，Interruptin B 的毒力稍高于鱼藤酮；对亚洲玉米螟 3 龄幼虫的毒力相差不大，其 LC_{50} 值分别为 346.23 μg/mL 和362.43 μg/mL。

2.3　Interruptin B 对斜纹夜蛾幼虫血细胞的影响

Interruptin B 对斜纹夜蛾幼虫血淋巴中血细胞数量有明显的影响，在 0.5 μg/头剂量下注射处理后 24 h 和 48 h，试虫血细胞数量分别下降了 11.44% 和 18.49%；1.0 μg/头剂量处理后，则分别下降了 24.95% 和 34.69%。随着时间延长和剂量升高，试虫血淋巴中血细胞数降低率逐渐提高（表 3）。

表 3　Interruptin B 注射处理对斜纹夜蛾 4 龄幼虫血淋巴中血细胞数量的影响

Table 3　Effect of Interruptin B injected into the 4th instar larvae of *Spodoptera litura* on the number of blood corpuscle

处理 Treatment	浓度(μg/头) Concentration (μg/larva)	处理后 24 h 24 h after treatment		处理后 48 h 48 h after treatment	
		血细胞数量 Number of blood corpuscles ($\times 10^5$/mL)	血细胞数降低率(%) Reduction rate of blood corpuscles	血细胞数量 Number of blood corpuscles ($\times 10^5$/mL)	血细胞数降低率(%) Reduction rate of blood corpuscles
CK	0	137 ± 2 a		164 ± 5 a	
Interruptin B	0.5	121 ± 2 b	11.44 ± 1.48	123 ± 4 b	24.95 ± 2.68
	1	112 ± 6 c	18.49 ± 4.70	107 ± 4 c	34.69 ± 2.34

表中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误（n = 30），同列数据后字母不同者表示在 0.05 水平差异显著（DMRT 多重比较）。The data in the table are mean ± *SE* of three replications (n = 30). Data within a column followed by different letters are significantly different at the 0.05 level (DMRT test).

2.4　Interruptin B 对斜纹夜蛾离体培养卵巢细胞增殖的抑制作用

以鱼藤酮为对照，采用 MTT 法，研究了 Interruptin B 对斜纹夜蛾离体培养卵巢细胞增殖的抑制作用。

结果显示，Interruptin B 对 SL 细胞具有良好的

增殖抑制作用(表4)。处理后24 h, Interruptin B 和鱼藤酮对 SL 细胞的抑制中浓度(IC_{50})分别为13.51 μg/mL和52.31 μg/mL, 两者活性差异显著(F =951.31, df =1, 5, P =0.0010); 处理后48 h, 对 SL 细胞的 IC_{50} 值分别为4.11 μg/mL 和27.68 μg/mL, 两者活性差异显著(F =280.12, df =1, 5, P =0.0036)。随着时间的延长, Interruptin B 对 SL 细胞的增殖抑制作用提高。

表4 Interruptin B 和鱼藤酮对斜纹夜蛾卵巢细胞的增殖抑制作用

Table 4 The inhibition effect of Interruptin B and rotenone against *Spodoptera litura* ovary cells

处理 Treatment	处理时间 Treatment time (h)	毒力回归方程 Toxicity regression equation	IC_{50} (95% CI) (μg/mL)	P 值 P-value in t test
Interruptin B	24	$y=4.0472+(0.8428\pm0.107)x$	13.51(6.61 – 27.62)	1.57
	48	$y=4.1794+(1.3359\pm0.215)x$	4.11(3.27 – 5.68)	2.70
鱼藤酮 Rotenone	24	$y=3.1047+(1.1028\pm0.211)x$	52.31(29.29 – 93.42) *	1.48
	48	$y=2.5119+(1.7252\pm0.318)x$	27.68(20.56 – 37.28) *	3.04

* 不同药剂处理相同时间后在0.01 水平上差异显著(t 检验, $P<0.01$)。* There are significant differences between different treatments after the same treatment time at the 0.01 level (t test, $P<0.01$).

2.5 Interruptin B 对斜纹夜蛾离体培养卵巢细胞生长密度的影响

本文采用 XD-101 型倒置显微镜, 研究了 Interruptin B 对 SL 细胞生长密度的影响。在倒置显微镜下, 采用 Olympus 显微成像系统拍照(标尺为100 μm), 采用 Photoshop CS3 的标尺和计数工具, 统计换算圈定图片面积, 并计算细胞数量, 从而得出细胞密度, 每重复随机选定3个视野拍照, 每图片随机圈定5个面积, 从而统计细胞密度。具体结果见图2。

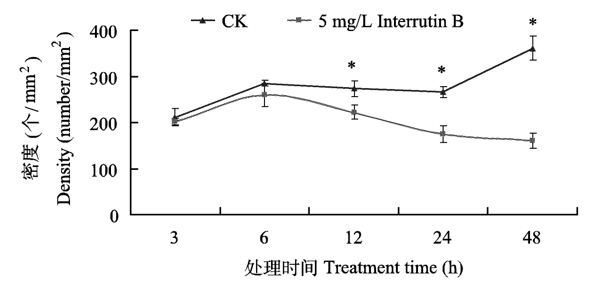


图2 5 mg/L Interruptin B 对斜纹夜蛾离体养卵巢细胞生长密度的影响

Fig. 2 Effect of 5 mg/L Interruptin B on the density of *Spodoptera litura* ovary cells

: 不同处理时间的数据与对照相比在0.05 水平上差异显著(t 检验, $P<0.05$), 下图同。 indicates significant differences between the data after different treatment time and the control at the 0.05 level (t test, $P<0.05$). The same below.

从图2可知, Interruptin B 处理 SL 细胞6 h 后, 可显著降低细胞生长密度。5 mg/L Interruptin B 处理 SL 细胞后3, 6, 12, 24 和48 h, 细胞密度分别为202.61, 258.99, 221.99, 174.42 和160.32 个/mm^2; 对照处理后, 细胞密度分别为211.42, 285.41, 273.08, 266.03 和361.17 个/mm^2。处理后3 h, Interruptin B 和对照对细胞的增殖抑制作用差异不显著, 处理后3–6 h, 细胞生长密度随时间的延长而升高, 未达到显著差异水平($P>0.05$); 处理后12–48 h, 细胞生长密度随时间的延长而下降, 并与对照差异显著($P<0.05$)。

2.6 Interruptin B 对 SL 细胞变形率的影响

正常情况下, SL 细胞生长良好, 细胞呈梭形, 当细胞生长受到抑制后, 细胞伸展状态差, 可能变圆、变小或呈其他不规则形状, 表现出细胞骨架结构或胞器受影响的症状, 因此, 形态变化是表现细胞长势和生命力的重要指标。本文采用 XD-101 型倒置显微镜, 研究了 Interruptin B 对 SL 细胞变形率的影响, 具体结果见图3。

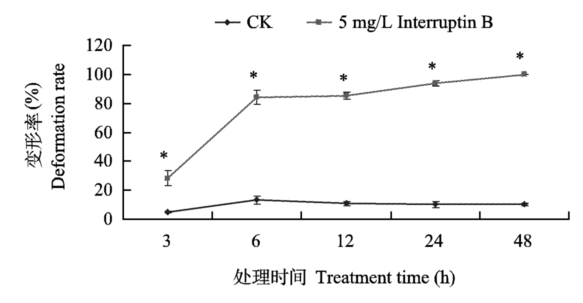


图3 5 mg/L Interruptin B 对斜纹夜蛾离体培养卵巢细胞变形率的影响

Fig. 3 Effect of 5 mg/L Interruptin B on the shape of *Spodoptera litura* ovary cells

从图 3 可以看出，Interruptin B 对 SL 细胞形态具有显著影响。Interruptin B 处理后，细胞生长情况受到显著抑制，细胞伸展状态差，细胞逐渐变圆、变小、核浆比例变小，细胞之间失去连接，部分细胞脱落漂浮于培养基中，部分细胞出现核固缩或核碎裂，处理后 3，6，12，24 和 48 h，细胞变形率分别为 28.18%，83.90%，85.18%，93.93% 和 100%，各处理时间均与对照具有显著差异（$P<0.05$），随着时间的延长，Interruptin B 对 SL 细胞的变形影响显著增加。对照处理后，SL 细胞长势良好，多数呈梭形，处理后 3，6，12，24 和 48 h，细胞变形率分别为 4.91%，13.33%，10.68%，10.07% 和 10.08%，处理后 6 h，对照溶剂影响下，细胞有一定的变形率，但变形率较低。

2.7 Interruptin B 对斜纹夜蛾离体培养卵巢细胞贴壁生长的影响

正常情况下，斜纹夜蛾离体培养卵巢细胞生长良好，并贴壁生长，当细胞生命力受到影响后，细胞贴壁能力下降，因此，细胞贴壁率是评价细胞生命力的重要指标之一。本文采用倒置显微镜，研究了 Interruptin B 对 SL 细胞贴壁率的影响，具体结果见图 4。

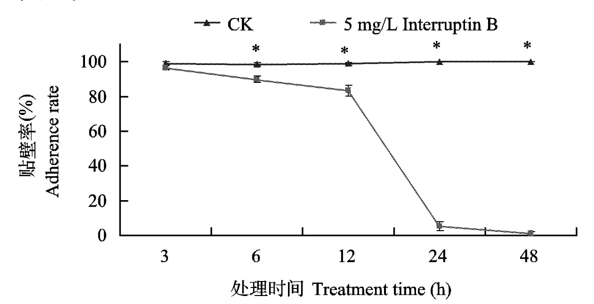


图 4 5 mg/L Interruptin B 对斜纹夜蛾离体培养卵巢细胞贴壁的影响

Fig. 4 Effect of 5 mg/L Interruptin B on the adherence rate of *Spodoptera litura* ovary cells

从图 4 可以看出，Interruptin B 可以显著降低 SL 细胞贴壁率。Interruptin B 处理后 3，6，12，24 和 48 h，细胞贴壁率分别为 96.59%，89.90%，83.18%，5.06% 和 1.09%，随着时间的延长，细胞收缩变圆，不能正常贴壁，并逐渐脱离培养皿，贴壁率逐渐下降，处理后 24 h 和 48 h，视野内出现大量漂浮细胞和细胞碎片，只有极少数细胞贴壁。对照处理后 3，6，12，24 和 48 h，细胞贴壁率分别为 99.00%，98.33%，98.81%，100% 和 100%，细胞长势良好，平铺贴在培养皿上，细胞多呈梭形，随时间的延长，细胞融合成片，甚至呈多层生长。处理后 6－48 h，Interruptin B 对 SL 细胞贴壁率的影响均显著高于对照（$P<0.05$）。

3 讨论

本研究表明，Interruptin B 对小菜蛾幼虫具有良好的毒杀活性和一定的拒食活性，对亚洲玉米螟幼虫具有拒食活性，能降低斜纹夜蛾幼虫血细胞数量，对 SL 细胞具有显著的增殖抑制作用，可明显改变细胞形态，影响细胞骨架结构，降低细胞生长密度和细胞贴壁率，显著降低细胞生命力。这表明 Interruptin B 具有作为杀虫剂开发的潜力。

Quadri 等（2000）从蕨类植物 *Cyclosorus interruptus* 中分离得到 7 个结构相似的 Interruptin 类化合物（Interruptin A，B，C，D，E，F 和 G）。Interruptin D ~ G 结构与 Interruptin A ~ C 相比，1′，2′，7 和 8 位碳原子与 7 位上的羟基闭合形成分子中第 3 环，而 Interruptin A ~ C 的结构没有这个环；Interruptin A ~ C 的结构非常相似，仅在 2′和 3′位上有细微差别。研究表明，Interruptin 类化合物结构上的细小差别就对其活性具有重要影响，结构中第 3 环的存在与细胞毒性直接相关。Interruptin D 既没有抑菌活性也没有细胞毒性，Interruptin A 对 *Bacillus cereus*（ATCC 10702），*Staphylococcus epidermidis*（ATCC 12228），*Micrococcus luteus*（ATCC 9431）和鼻咽癌细胞（ATCC CCL 17）都有明显的抑制活性，Interruptin E，F 和 G 与 Interruptin A 相比有一定抑菌活性，Interruptin B 仅对鼻咽癌细胞细胞有抑制活性，而没有抑菌活性（Quadri *et al.*，2000）。本研究结果表明，Interruptin B 既对小菜蛾、亚洲玉米螟和斜纹夜蛾幼虫有活性，也对 SL 细胞的增殖具有抑制作用。由此可推测，Interruptin 类其他化合物也可能具有较好的生物活性，应对其系列化合物进行构效关系分析，可为新结构类型的杀虫剂开发提供参考。

本研究表明，Interruptin B 的作用方式为毒杀、拒食并抑制细胞增殖。该化合物通过对细胞增殖的抑制，影响细胞骨架结构等，从而控制害虫。这表明 Interruptin B 作用机理与现有化学合成农药不同，可望成为抗性害虫治理的有效药剂。

参考文献（References）

China Pesticide Information Network, 2009. http://www.

chinapesticide. gov. cn/. ［中国农药信息网, 2009. http://www. chinapesticide. gov. cn/］

Deng RQ, Lee CY, 1995. A study on the cytopathology of larval *Spodoptera litura* infected with SLNPV. *Supplement to the Journal of Sun Yatsen University*, 2: 18 –21. ［邓日强, 利翠英, 1995. 斜纹夜蛾幼虫感染核型多角体病毒后血细胞的病理变化. 中山大学学报论丛, 2: 18 –21］

Fang JB, 2006. Bioactive Constituents from *Alternanthera philoxeroides* & *Abacopteris penangiana*. PhD Dissertation, Tianjin University, Tianjin. 89 pp. ［方进波, 2006. 民间药物空心莲子草和披针新月蕨生物活性成分研究. 天津: 天津大学博士学位论文. 89 页］

Himeji M, Ohtsuki T, Fukazawa H, Tanaka M, Yazaki S, Ui S, Nishio K, Yamamoto H, Tasaka K, Mimura A, 2007. Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis*-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell. *Cancer Letters*, 245: 269 –274.

Huang SQ, 2008. Insecticidal Activities and Chemical Constituents of *Pronephrium megacuspe*. PhD Dissertation, South China Agricultural University, Guangzhou. 36, 74. ［黄素青, 2008. 微红新月蕨的杀虫活性与有效成分. 广州: 华南农业大学博士学位论文. 36, 74］

Huang SQ, Zhang ZX, Li YZ, Xu HH, 2010. Anti-insect activity of the methanol extracts of fern and gymnosperm. *Agricultural Sciences in China*, 9(2): 249 –256.

Quadri-Spinelli T, Heilmann J, Rali T, Sticher O, 2000. Bioactive coumarin derivatives from the fern *Cyclosorus interruptus*. *Planta Medica*, 66(8): 728 –733.

Stipanovic RD, Elissalde MH, Altman DW, Norman JO, 1990. Cell culture bioassay to evaluate allelochemical toxicity to *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 83: 737 –741.

Tanaka N, Murakami T, Wada H, Gutierrez A B, Saiki Y, Chen CM, 1985. Chemical and chemotaxonomical studies of Filices. LXI. Chemical studies on the constituents of *Pronephrium triphyllum* Hollt. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 33(12): 5231 –5238.

Yang XZ, 2002. The Study of Antibiosis and Antiphlogosis Activity of *Abacopteris penangiana*. MSc Thesis, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan. 57 pp. ［杨新洲, 2002. 披针新月蕨抗菌消炎活性成分研究. 武汉: 华中科技大学同济医学院硕士学位论文. 57 页］

Zhang GZ, Xu HH, Wu ZT, 2000. Antifeedant effect of extraction of *Stellera chameajasme* on *Pieris rapae*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 28(4): 464 –465. ［张国洲, 徐汉虹, 吴振廷, 2000. 瑞香狼毒根提取物对菜粉蝶幼虫的拒食作用. 安徽农业科学, 28(4): 464 –465］

Zhou QC, Yang H, Wang H, Hong HZ, 1997. Studies on new bioassays for pesticide: Ⅱ. The establishment and further development of cytobioassay for insecticide. *Journal of Huazhong Normal University*, 31(4): 456 –459. ［周青春, 杨红, 汪虹, 洪华珠, 1997. 农药生物测定新方法的研究: Ⅱ. 杀虫剂细胞生测体系的建立及改进. 华中师范大学学报(自然科学版), 31(4): 456 –459］

（责任编辑: 赵利辉）